



UNIWERSYTET SZCZECIŃSKI

WYDZIAŁ NAUK ŚCISŁYCH I PRZYRODNICZYCH

Instytut Biologii

dr hab. Anna Rymaszewska, prof. US

Szczecin, 29.08.2022

Katedra Genetyki i Genomiki

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Anny Weroniki Myczki

pt. „Prewalencja i genotypowanie szczepów *Anaplasma phagocytophilum*

wśród zwierząt kopytnych w Polsce”

wykonanej w Instytucie Parazytologii im. Witolda Stefańskiego

Polskiej Akademii Nauk w Warszawie

pod kierunkiem dr hab. Zdzisława Laskowskiego, prof. IP PAN

Podstawą dysertacji doktorskiej pani mgr Anny Weroniki Myczek jest cykl trzech prac doświadczalnych, opublikowanych w latach 2021 (dwa artykuły) i 2022 (jeden artykuł). Zaprezentowana do oceny rozprawa przedstawia wyniki wartościowe zarówno dla badań o charakterze podstawowym oraz aplikacyjnym.

Anaplasma phagocytophilum jest bezwzględnie wewnątrzkomórkowym patogenem kręgowców. U ludzi powoduje zachorowania na anaplazmozę granulocytarną, w Europie o przebiegu łagodnym, w niektórych regionach świata możliwy przebieg ciężki, zakończony zgonem. U zwierząt domowych, szczególnie małych przeżuwaczy wywołuje poważne schorzenie, które może prowadzić do śmierci. Wektorem bakterii *A. phagocytophilum* są kleszcze, w Polsce najczęściej jest to *Ixodes ricinus*. W krążeniu bakterii w środowisku istotne znaczenie odgrywają zwierzęta dzikie, szczególnie ssaki kopytne, które stanowią rezerwuuar dla bakterii. Ze względu na zróżnicowany przebieg choroby u różnych gatunków od lat prowadzone są badania, które pozwalają ujawnić zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe *A. phagocytophilum*. Poznanie genotypów anaplazm ma charakter badań podstawowych, a jednocześnie nie można mu odmówić znaczenia aplikacyjnego. Wykazanie obecności szczepów chorobotwórczych dla ludzi i zwierząt na danym obszarze ma istotne znaczenie medyczno-weterynaryjne. Podjęta przez Doktorantkę tematyka badawcza wpisuje się więc w nurt dyskusji prowadzonej przez wiele ośrodków naukowych w świecie.

Ocena formalna pracy. Rozprawa doktorska Pani mgr Anny W. Myczek składa się z trzech publikacji oryginalnych oraz ich omówienia. Główne rozdziały to: cele pracy i hipotezy badawcze, wykaz publikacji, będących podstawą rozprawy doktorskiej, streszczenie (w języku polskim i angielskim), wstęp, materiały, metody, załączone publikacje z oświadczeniami współautorów, najważniejsze wyniki i wnioski, wyniki, dyskusja, podsumowanie, wnioski i piśmiennictwo. Praca została poprzedzona wykazem skrótów. W zaprezentowanym spisie treści widać chaos. Brak ponumerowania poszczególnych rozdziałów jak i podobieństwo nazw (powtarzające się „wyniki” czy „wnioski”) wprowadza zamieszanie. Trudno na podstawie spisu treści wywnioskować co jest rozdziałem, a co podrozdziałem. Wstęp, Materiały, Metody – są pisane normalną czcionką, tytuły podrozdziałów – pogrubioną; jeden z rozdziałów (?) zatytułowano „Genotypowanie szczepów *Anaplasma phagocytophilum* izolowanych od saren europejskich (*Capreolus capreolus*) i jeleni szlachetnych (*Cervus elaphus*)”. Według mnie jest to za długi tytuł, ponadto napisanym normalną czcionką w spisie treści, a następujące po nim Wyniki, a dalej Dyskusja – są wytłuszczone i nie wiadomo, czy to podrozdziały, czy rozdziały. Sumując – spis treści jest mało przejrzysty. Następujący po nim **Wykaz skrótów**, jest jak najbardziej wskazany w obszernych opracowaniach. Dlaczego jednak gen „*msp*” nie został napisany kursywą, tak jak gen *ankA* czy *groEL*?

Artykuły składające się na cykl są opublikowane w renomowanych czasopismach z listy JCR i wysoko punktowanych na listach MNiSW. Wartość współczynnika oddziaływania wynosi średnio 2.816 (IF-1.440 dla publikacji 1; 4.066 – dla publikacji 2; 2.942 dla publikacji 3). MNiSW przyznało czasopismom: Acta Parasitologica – 40 pkt (publikacja 1), Pathogens – 100 pkt (publikacja 2) i Animals – 100 pkt (publikacja 3). Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej pani Anny W. Myczki są wieloautorskie (3 autorów – publ. 1; 6 autorów – publ. 2 i 3) i w każdej Doktorantka jest pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym. Brak natomiast szczegółowej informacji o wkładzie procentowym Pani Myczki w poszczególnych artykułach. Zamieszczone oświadczenia współautorów wskazują na ich rolę w przygotowaniu publikacji.

Rozprawa doktorska mgr Anny W. Myczek obejmuje łącznie 101 stron, z czego 47 stron stanowią załączone publikacje i ich omówienie oraz oświadczenia współautorów.

Ocena merytoryczna. Wyznaczone przez Doktorantkę cele są czytelnie sformułowane w czterech podpunktach, a poniżej znajdują się hipotezy badawcze. Rozdział ten jest zrozumiały, niemniej wkraść się błąd - śledziona nie jest tkanka obwodowa, jest narządem. **Streszczenie** pracy w języku polskim i angielskim powinno się znajdować według mnie na końcu rozprawy. **Wstęp** stanowi obszerny rozdział, w którym Doktorantka przedstawia szczegółową charakterystykę bakterii *A. phagocytophilum*, uwzględniając jej zróżnicowanie genetyczne i powiązanie poszczególnych ekotypów z wektorami i rezerwuarem. Rozdział jest interesująco napisany i wskazuje na szeroką wiedzę Pani Anny W. Myczek oraz studiowanie aktualnej literatury. Tak przygotowany wstęp jest też dobrym wprowadzeniem czytelnika w problemy badawcze poruszane w rozprawie.

Zamierzone cele Doktorantka realizowała poprzez zebranie odpowiedniego materiału i zastosowanie nowoczesnych metod badawczych odpowiednio dobranych do swoich analiz. **Materiałem** do badań były tkanki pobrane od 6-ciu gatunków zwierząt dzikich i hodowlanych, tj. jelenia szlachetnego, sarny europejskiej, daniela zwyczajnego, dzika euroazjatyckiego, łosia euroazjatyckiego i żubra europejskiego. Wycinki zostały pobrane od zwierząt martwych lub legalnie eliminowanych w przypadku zwierząt dzikich oraz od zwierząt hodowlanych – podczas uboju. W rozdziale Materiały zamieszczono wymagane zgody na pobieranie materiału biologicznego od zwierząt objętych ochroną gatunkową. Dane zostały przedstawione przejrzysto, zamieszczone w rozdziale tabela i mapka dopełniają całości. Rozdział **Metody** opisuje kolejne etapy analizy, tj. izolację DNA, Reakcję Łańcuchową Polimerazy, Analizy sekwencji i Analizy statystyczne. Sposób prezentacji zastosowanych metod nie jest dla mnie satysfakcjonujący. Zabrakło mi informacji o sposobie pobierania materiału, jego konserwacji do czasu analiz czy homogenizacji tkanek – to niezwykle istotne etapy pracy, które w przypadku analiz molekularnych mają znaczący wpływ na wyniki. Niezrozumiałym jest też dla mnie sposób prezentacji podrozdziału Reakcja Łańcuchowa Polimerazy, być może inny tytuł byłby stosowniejszy w tym wypadku. Dlaczego zastosowano tutaj dodatkowo Piśmiennictwo, jako „podrozdział”? Dlaczego Doktorantka nie podkreśliła bardziej faktu, że zespół, w którym pracowała zaprojektował własne startery do amplifikacji fragmentu genu 16S rRNA *Anaplasma* spp. i nie omówiła tego szczegółowo? Ponadto, Doktorantka opisuje sprzęt, na jakim wykonywała badania oraz sposób wizualizacji produktów PCR, ale jakiej polimerazy użyła do amplifikacji? Taka informacja pozwoliłaby zweryfikować prawidłowość opracowanych profili termiczno-czasowych.

Publikacje będące podstawą dysertacji stanowią zwarty cykl dotyczący występowania i charakterystyki molekularnej szczepów *A. phagocytophilum* w zwierzętach dzikich i hodowlanych. Doniesienia są zwięzłe, przygotowane zgodnie z wymogami czasopism, oceniane przez co najmniej dwóch niezależnych recenzentów. Najważniejsze wnioski wypływające z nich to: 1. w Polsce północno-wschodniej i centralnej, zwierzęta kopytne tj. jelenie, sarny, żubry, łosie i dziki stanowią naturalny rezerwuuar *A. phagocytophilum*; 2. Śledziona, jak i wątroba mogą być wykorzystywane do detekcji *A. phagocytophilum*, przy czym badanie śledziony daje pełniejszy obraz zakażenia zwierząt; 3. DNA anaplazm częściej wykrywano u jeleni żyjących na wolności niż u zwierząt hodowlanych. Ponadto Doktorantka podkreśla, że są to pierwsze badania łosia euroazjatyckiego w oparciu o materiał pochodzący ze śledziony i wątroby. Równie ważnym osiągnięciem są pionierskie badania największej populacji w świecie wolno żyjących żubrów z Bieszczad, dokonane przez Panią Annę W. Myczek. Genotypowanie bakterii wykazało, że wykryte u łosia euroazjatyckiego (*Alces alces*) i żubra europejskiego (*Bison bonasus*) szczepy *A. phagocytophilum* mogą być patogenne dla ludzi. Uzupełnieniem cyklu publikacji jest Rozdział (?): „Genotypowanie szczepów *Anaplasma phagocytophilum* izolowanych od saren europejskich (*Capreolus capreolus*) i jeleni szlachetnych (*Cervus elaphus*)”. Doktorantka przedstawia w nim wyniki analizy dwóch genów, *groEL* oraz *ankA*, wykonane dla DNA anaplazm pozyskanych z materiału od dzikich przeżuwaczy. Dla genu *ankA* opisała

7 haplotypów, przy czym trzy z nich były unikalne (dwa dla izolatów z jeleni i jeden dla izolatów z saren). Zarówno w tym rozdziale, jak i w publikacjach zamieszczono drzewa, ukazujące zależności między sekwencjami *A. phagocytophilum* pozyskanymi od różnych gatunków zwierząt. Wykonane w odpowiednich programach są prawidłowo skonstruowane, jednak nie do końca trafne. Na drzewie jeden kład stanowi np. *Bos taurus*, *Ovis aries* i *Sus scrofa* (str. 80) czy *Canis lupus familiaris* i *I. ricinus* (str. 82). Wydaje mi się, że *A. phagocytophilum*, jako główna bohaterka powyższych analiz, powinna być umieszczona jako pierwsza (tj. numer akcesyjny z Banku Genów), a dopiero potem zwierzę, od którego pozyskano materiał genetyczny bakterii i kraj, z którego pochodzi.

Dyskusja jest kolejnym rozdziałem pracy doktorskiej mgr Anny W. Myczek. Zamieszczono w niej tabelę 3 zatytułowaną „Haplotypy fragmentu genu *groEL* z izolatów *A. phagocytophilum* od saren europejskich i jeleni szlachetnych i identyczne do nich w 100% sekwencje z bazy GenBank, z podziałem na ekotypy” czy rycinę 9 (zdjęcia żeli agarozowych...), które moim zdaniem powinny znajdować się w części poświęconej wynikom. Dyskusja jest rozdziałem, który daje duże możliwości autorowi. Pozwala podsumować własne wyniki i przedstawić je na tle doniesień literaturowych, ale także zaprezentować nam własną interpretację czy przemyślenia dotyczące tematyki badawczej. W tym rozdziale jest też miejsce na weryfikację postawionych wcześniej hipotez. Być może niepotrzebny byłby oddzielny rozdział **Podsumowanie**. W Dyskusji Doktorantki momentami spotykamy się z omówieniem wyników, co powinno mieć miejsce w rozdziale Wyniki.

Syntetyczne **Wnioski**, sformułowane w siedmiu punktach, są w większości odpowiedzią na postawione wcześniej cele. Wyjątkiem jest trzeci cel dotyczący charakterystyki molekularnej szczepów *A. phagocytophilum* (str. 7), gdzie odpowiedź znajduje się w **Podsumowaniu** (str. 88-89). Dość śmiały i zaskakujący wniosek zawarto w ostatnim punkcie, w którym Doktorantka zasugerowała oznaczenie nowego gatunku anaplazm, występującego u sarny europejskiej (*C. capreolus*). Czy analiza fragmentów trzech genów dla niewielkiej liczby osobników uprawnia nas do tak daleko idących wniosków? A może właśnie ten problem warto było też omówić w rozdziale Dyskusja?

Ostatni z rozdziałów rozprawy doktorskiej Pani Anny W. Myczek to **Piśmiennictwo**. Zawiera on 93 pozycje literaturowe, w większości anglojęzyczne oraz siedem pozycji zaczerpniętych ze stron internetowych. W tych ostatnich brakuje informacji o dacie cytacji. Literatura, na której opiera się Doktorantka w swoich rozważaniach, jest aktualna i świadczy o ciągłym śledzeniu bieżących doniesień przez Autorkę omawianej dysertacji.

Sumując praca została przygotowana poprawnie, choć Doktorantka nie ustrzegła się błędów. Czasem występują zbyt górnolotne określenia (np. str. 14/15: „...asygnuje krew jako nominalny materiał biologiczny”; pub. 2: „najczęściej stosowane markery genetyczne do genotypowania...” – przy czym podana jest tylko jedna pozycja literaturowa); w publikacjach stanowiących podstawę rozprawy stosunkowo mało cytowanych badań z Polski; cytowania nie zawsze są trafne. Autorka stosuje dużo

przecinków, co nie ułatwia zrozumienia tekstu, zdarzają się błędy gramatyczne i stylistyczne. Niniejsze uwagi nie wpływają na wartość merytoryczną dysertacji doktorskiej mgr Anny W. Myczek.

Przedstawiona do recenzji praca wskazuje na dobre przygotowanie Doktorantki do rozwiązywania problemów naukowych, na Jej dużą wiedzę teoretyczną i praktyczną. Wykazała się Ona umiejętnością stawiania hipotez, czasem nawet bardzo śmiałych, interpretacji wyników badań, a także syntetycznego zaprezentowania ich w formie pisanej. Zaplanowanie eksperymentu, od pozyskania trudnego do zdobycia materiału badawczego, poprzez właściwie dobraną metodykę, wykonanie analiz laboratoryjnych do wyciągnięcia wniosków świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki. Badania przedstawione przez mgr Annę W. Myczek w rozprawie doktorskiej i wynikające z nich wnioski mają istotne znaczenie poznawcze z punktu widzenia nauk podstawowych, ale stanowią także dużą wartość praktyczną. Wiedza o krążeniu w danym środowisku patogenów odkleszczowych, do jakich należy *A. phagocytophilum*, m. in. ułatwia diagnostykę lekarzom medycyny i weterynarii.

Wnioski końcowe. W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Anny Weroniki Myczki spełnia warunki określone w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Przedłożona przez Doktorantkę dysertacja stanowi istotny wkład w rozwój nauk biologicznych w zakresie biologii. W związku z tym zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Parazytologii im. Witolda Stefańskiego PAN o dopuszczenie mgr Anny Weroniki Myczki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



